(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0067553
(43) 공개일자 2011년06월22일

(51) Int. Cl.
C07K 19/00 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0124191
(22) 출원일자 2009년12월14일
심사청구일자 2009년12월14일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
전태훈
서울특별시 송파구 오륜동 올림픽선수촌아파트 236동 1802호
이한형
서울특별시 마포구 성산2동 성산시영아파트 9동 405호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이문섭

전체 청구항 수 : 총 10 항

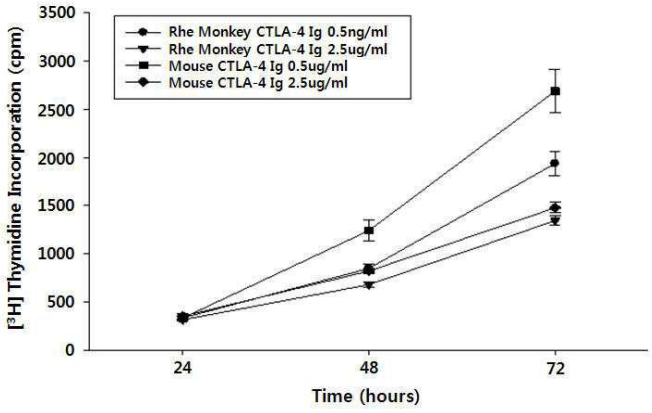
(54) 레서스 원숭이 ＣＴＬＡ-4 융합 이뮤노글로불린

(57) 요 약

본 발명은 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 서열번호 2의 38 ~ 161번째 아미노산 서열을 갖는 레서스 원숭이(Rhesus monkey) CTLA-4 세포외 도메인(extracellular domain)과 인간 이뮤노글로불린(human IgG)의 Fc 영역(Fc region)으로 이루어진 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린에 관한 것이다.

본 발명에 따라 상기 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린을 제조할 수 있으며, 상기 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린을 레서스 원숭이의 T 세포에 처리하는 경우, 기존에 사용하던 타종의 CTLA-4 융합 단백질보다 더 효과적으로 T 세포의 활성을 억제함을 확인하였다. 따라서 본 발명의 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린을 사용함으로써 레서스 원숭이를 이용한 동종장기이식 실험시 면역억제의 효율을 높일 수 있으며, 상기 융합 이뮤노글로불린을 유효성분으로 포함하는 면역세포 증식 억제제의 사용이 기대된다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자

박정규

서울특별시 서초구 잠원동 대림아파트 1동 306호

김정식

경기도 과천시 중앙동 주공APT 119-303호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A040004092310701000

부처명 한국보건산업진흥원

연구관리전문기관

연구사업명 보건의료기술개발사업

연구과제명 돼지췌도 세포이식시 이종간의 면역관용 유도 기술 개발

기여율

주관기관 고려대학교 생명자원연구소

연구기간 2009년 04월 01일 ~ 2010년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 38 ~ 161 번째 아미노산 서열을 갖는 레서스 원숭이(Rhesus monkey) CTLA-4 세포외 도메인(extracellular domain)과 인간 이뮤노글로불린(human IgG)의 Fc 영역(Fc region)으로 이루어진 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린은 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린.

청구항 3

서열번호 2의 38 ~ 161 번째 아미노산 서열을 코딩하는 레서스 원숭이(Rhesus monkey) CTLA-4 세포외 도메인(extracellular domain) 유전자와 인간 이뮤노글로불린(human IgG)의 Fc 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 레서스 원숭이(Rhesus monkey) CTLA-4 세포외 도메인(extracellular domain) 유전자는 서열번호 1의 112 ~ 482 번째 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 재조합 발현벡터는 도 2의 (B)의 개열지도를 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 6

제 3항의 재조합 발현벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 숙주세포는 CHO 세포인 것을 특징으로 하는 형질전환된 숙주세포.

청구항 8

제 1항의 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린을 유효성분으로 포함하는 면역세포 증식 억제제.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 융합 이뮤노글로불린에 의해 동종반응(allogeneic response)이 차단됨으로써 면역억제되는 것을 특징으로 하는 면역세포 증식 억제제.

청구항 10

시험관 내에서 면역세포에 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린을 처리하는 것을 포함하는 면역세포 증식 억제 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 서열번호 2의 38 ~ 161번째 아미노산 서열을 갖는 레서스 원숭이(Rhesus monkey) CTLA-4 세포외 도메인(extracellular domain)과 인간 이뮤노글로불린(human IgG)의 Fc 영역(Fc region)으로 이루어진 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 면역계에서 T 림프구의 활성은 여러 다른 면역계 세포를 조절하는데 중요한 역할을 한다. 이러한 T 림프구가 활성을 일으키기 위해서는 항원제시세포(antigen presenting cell; APC)로부터 두 가지의 신호를 전달 받아야 한다. 즉 항원제시세포가 항원을 인식하고 주요조직적합성항원(major histocompatibility complex; MHC)을 통해 T 세포의 항원수용체(T cell antigen receptor; TCR)에 항원을 제시해 주는 신호와 함께 보조자극 신호가 필수적으로 제시되어야만 T 세포가 활성을 일으킬 수 있다. 이러한 보조자극 신호 중에 대표적으로 알려진 것이 T 세포에 발현되어지는 CD28이다. CD28은 44 KDa의 당단백질(glycoprotein)로 APC에 발현되어진 CD80(B7-1), CD86(B7-2)과 결합하여 T 세포에 사이토카인(cytokine)의 생산, 전사 활성(transcription activity), 세포생존(cell survival) 등을 증가시킨다 [Lenschow et al., 1996].

[0003] 특히, CTLA-4(Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4; CD152)는 CD28에 경쟁적으로 작용하는 이뮤노글로불린(Ig) 거대족의 구성원으로서 1987년 처음 발견되었다. 상기 CTLA-4는 활성화된 T 세포의 세포 표면에 발현되어 CD80, CD86과 결합하여 T 세포에 신호를 전달하는 역할을 한다. CTLA-4는 CD28에 비해 리간드(ligand)에 높은 친화력을 지녔다 [Linsley et al., 1994]. 이러한 CTLA-4는 CD28과는 달리 리간드에 결합하여 T 세포 활성 억제신호를 매개하며 [Waterhouse et al., 1996], T 세포의 IL-2, IL-2 수용체의 발현을 감소시켜 활성화된 T 세포의 활성과 증식을 억제한다 [Krummel et al., 1996].

[0004] 상기의 CTLA-4와 같은 보조자극인자는 T 세포의 면역반응을 조절하는 필수 요소이기 때문에, 이를 조절하여 면역반응을 제어하려는 연구가 많이 진행되고 있다. 특히 CTLA-4 보조자극인자를 이용한 면역조절로서 재조합 항체(면역글로불린 융합단백질)의 기술을 응용하여 많이 이루어지고 있다. 예컨대, CTLA-4가 CD80, CD86과의 높은 결합력을 가지므로 수용성의 CTLA-4를 만들어 T 세포의 CD28을 통한 보조자극신호차단제로 많이 이용하며 [Lenschow et al., 1992; Kosuge et al., 2003; Abrams et al., 1999], 인간과 마우스의 CTLA-4 유전자를 이용한 CTLA-4 이뮤노글로불린이 발명되었으며 그 효과도 확인하였다 [Gerstmayer et al., 1997]. 하지만 레서스 원숭이(Rhesus monkey)의 CTLA-4를 이용한 면역글로불린 융합단백질(Ig)은 아직 발명되어지지 않았으며, 그 효과도 알려지지 않았다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 레서스 원숭이(Rhesus monkey)의 CTLA-4를 이용하여 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린을 제조하였으며, 상기 융합 이뮤노글로불린을 레서스 원숭이 T 세포에 적용하는 경우, 레서스 원숭이 T 세포의 활성을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 레서스 원숭이 T 세포의 활성을 효과적으로 억제하는 장점을 갖는 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린을 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린을 이용한 면역세포 증식 억제제를 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0008] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 레서스 원숭이(Rhesus monkey) CTLA-4 세포외 도메인(extracellular domain)과 인간 이뮤노글로불린(human IgG)의 Fc 영역(Fc region)으로 이루어진 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린을 제공한다.

[0009] 본 발명의 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린에 있어서, 상기 레서스 원숭이 CTLA-4(진뱅크 허가번호 NM_001044739.1)의 세포외 도메인은 CD28에 결합할 수 있는 어떠한 레서스 원숭이 CTLA-4의 세포외 도메인도 될 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 2의 38 ~ 161 번째 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0010] 또한 상기 인간 이뮤노글로불린의 Fc 영역은 인간 이뮤노글로불린 중 항원이 결합하는 Fab 영역(fragment antigen binding region) 이외의 영역으로서 백혈구나 마크로파지(macrophage) 등과 결합할 수 있는 어떤 영역도 될 수 있으며, 구체적으로 그 서열은 NCBI의 AAA02914에서 얻을 수 있다.

[0011] 또한 상기 레서스 원숭이 CTLA-4의 세포외 도메인과 인간 이뮤노글로불린 Fc 영역사이에는 flexible region인 힌지(hinge)서열이 포함될 수 있으며, 본 발명에서 상기 힌지 서열은 인간 이뮤노글로불린의 Fc 영역에 연결된 것을 그대로 사용하였다.

[0012] 본 발명의 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린에 있어서, 상기 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린은 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 한다. 또한 상기 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린은 서열번호 3의 염기서열을 갖는 유전자에 의해 코딩될 수 있다.

[0013] 또한 상기 융합 이뮤노글로불린은 레서스 원숭이 CTLA-4 세포외 도메인의 N' 말단에 리더 펩타이드(leader peptide)를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 상기 용어 “리더 펩타이드(leader peptide)”는 분비성 단백질 전구체의 N-말단에 존재하고, 또한 천연 성숙 단백질에는 존재하지 않는 서열을 나타내며, 리더 펩타이드는 단백질 전구체로부터 절단되는 펩타이드를 나타낸다. 일반적으로 리더 서열은 세포 외로의 분비에 따라 프로테아제(또는 시그날 펩타이드)에 의해 절단된다. 이러한 리더 펩타이드는 생물종을 초월하여 일정한 공통된 서열상의 특징을 갖지만 어떤 생물종으로 분비기능을 나타내는 리더 펩타이드가 다른 생물종에서도 반드시 분비기능을 발휘한다는 것은 아니다. 프리프로 단백질 또는 프리 단백질에서, 당해 리더 펩타이드는 상이한 단백질 유래일 수 있거나, 목적 단백질에 천연으로 존재하는 리더 펩타이드일 수 있고, 사용하는 숙주의 분비형 단백질 유래가 바람직하다. 또는 사용하는 숙주의 코돈 사용 빈도에 따라 최적인 코돈을 갖도록 변형할 수 있다. 또한 본 발명의 목적에 사용할 수 있는 리더 펩타이드는 이로부터 유래하는 천연 성숙 단백질의 N-말단 아미노산 서열을 일부 함유할 수 있다. 본 발명에서는 구체적으로 “METDTLLLWVLLLWVPGSTGD”의 아미노산 서열을 갖는 리더 펩타이드를 사용하였다.

[0015] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 38 ~ 161 번째 아미노산 서열을 코딩하는 레서스 원숭이(Rhesus monkey) CTLA-4 세포외 도메인(extracellular domain) 유전자와 인간 이뮤노글로불린(human IgG)의 Fc 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.

[0016] 본 발명의 재조합 발현벡터에 있어서, 상기 레서스 원숭이(Rhesus monkey) CTLA-4 세포외 도메인(extracellular domain) 유전자는 서열번호 1의 112 ~ 482 번째 염기서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 상기 재조합 발현벡터는 상기 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린을 발현시킬 수 있는 복제가능한 어떤 발현벡터도 될 수 있으나, 바람직하게 도 2의 (B)의 개열지도를 갖는 RheCTLA-4IgG/pLNCX2인 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 볼 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0019] 본 발명의 숙주세포는 상기 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린을 발현하여 분비할 수 있는 어떠한 동물세포도 가능하나, 바람직하게는 CHO(chinese hamster ovary) 세포, COS-7(Monkey, African green) 세포,

NIH/3T3(Mouse fibroblast) 세포, BHK-21(Baby Hamster kidney, Syrian golden) 세포, Hela(Human Carcinoma) 세포, Vero(Monkey kidney, African green) 세포, 및 C127(Mouse) 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 세포를 사용하는 것이 좋으며, 더욱 바람직하게는 CHO 세포를 사용하는 것이 높은 형질전환율로 인하여 좋다. 본 발명의 실시예에서는 Tetracycline off system의 293GPG 세포와 포유동물 유래 세포주인 CHO 세포를 이용하여 형질전환 시켰다. 상기 293GPG 세포를 거쳐 형질전환하면 더욱 안정적으로 발현이 유지되고, 타겟 세포에 독성을 거의 주지 않는 장점이 있기 때문에 293GPG 세포를 거쳐 CHO 세포로 형질전환시켰다.

[0020] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 상기 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린을 유효성분으로 포함하는 면역세포 증식 억제제를 제공한다.

[0021] 본 발명의 면역세포 증식 억제제에 있어서, 상기 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린에 의해 동종반응(allogeneic response)이 차단됨으로써 면역억제되는 것을 특징으로 한다.

[0022] 본 발명의 상기 용어 "동종반응(allogeneic response)"은 동일한 종 사이의 장기이식에 있어서 일어나는 면역반응을 일컫는다. 면역반응을 일으키는 중요 항원은 주요조직적합성항원(MHC)으로써 세포에서의 발현양이 많아 항원으로 작용한다. 따라서 같은 종 사이의 이식에 있어서 MHC의 유사성이 없을 경우, 항원으로 인식하여 면역반응에 의한 거부 현상이 일어난다.

[0023] 본 발명의 실시예 에서는 본 발명의 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린과 생쥐 유래 CTLA-4 융합 단백질을 각각 레서스 원숭이의 T 세포에 처리하여 활성을 측정해본 경우, 본 발명의 융합 이뮤노글로불린이 T 세포의 활성을 더 효과적으로 억제함을 확인하였다(실시예 4). 따라서 기존에 사용하던 타종의 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린 보다 종 특이적인 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린을 사용함으로써 레서스 원숭이를 이용한 동종장기이식 실험에 면역억제의 효율을 높일 수 있다.

[0024] 본 발명의 면역세포 증식 억제제는 치료용 약제로 이용되기 위해서 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 또한 이들들은 비경구 투여(예컨대, 정맥 내, 피하, 복강 내, 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여될 수 있다.

[0025] 본 발명의 치료제는 치료학적으로 유효한 양으로 투여한다. 상기 "치료학적으로 유효한 양(therapeutically effective amount)"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 환자의 연령, 성별, 체중, 건강상태, 질병의 증상, 투여시간, 투여방법에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 0.01 ~ 100 mg이 투여될 수 있다.

[0026] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 시험관 내에서 면역세포에 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린을 처리하는 것을 포함하는 면역세포 증식 억제 방법을 제공한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0027] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0028] **< 실시예 1. RT-PCR 방법에 의한 유전자의 클로닝 >**

[0029] 레서스 원숭이(Rhesus monkey)의 말초혈액단핵구세포(Pheriperal Blood Mononuclear Cell; PBMC)를 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1 ml당 200 μl의 클로로포름(Chloroform, Sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리한 후, 추출한 2 μg의 mRNA를 주형으로 역전자 연쇄중합반응(RT-PCR)을 수행하여 cDNA를 복제하였다. 상기 cDNA를 주형으로하여 유전자 database에서 얻은 염기서열에 따라 하기 표 1의 (A)와 같이 프라이머를 제작한 후, 연쇄중합반응을 통해 레서스 원숭이 CTLA-4 유전자를 획득하였다. 획득한 레서스 원숭이 CTLA-4 유전자 전체 중 세포외 도메인(extracellular domain)을 포함하는 염기서열만을 얻기 위해 하기 표 1의 (B)와 같이 프라이머를 제작하여 다시 연쇄중합반응을 실시하였다. 이때, 역전사 효소는 Superscript Ⅲ(Invitrogen)를 사용하였으며, 중합효소는 Tag

polymerase(gene craft)를 사용하였다. 그 결과 하기 표 2의 프라이머와 PCR product를 얻었으며 sequencing 결과 진뱅크 No. NM_001044739와 100% 일치하였다. 상기 PCR product의 크기는 399 bp이다.

[0030] [표 1. 프라이머]

[0031]

	프라이머	
(A)	정방향	5'- TCC TGA AGA CCT GAA CAC CGC TC
	역방향	3'- AGA ATT GCC TCA GCT CTT GG
(B)	정방향	5'- GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC ATG CAC GTG GCC CAG
	역방향	3'- CGC GGA TCC GTC AGA ATC TGG GCA CGG

[0032] [표 2. 프라이머]

[0033]

	프라이머	
Rhe CTLA-4 extracellular domain	정방향	5'- GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC ATG CAC GTG GCC CAG
	역방향	3'- CGC GGA TCC GTC AGA ATC TGG GCA CGG

[0034] **< 실시예 2. 단백질 발현 플라스미드 제조 및 형질전환세포주 제작 >**

[0035] 레서스 원숭이(Rhesus monkey) CTLA-4 유전자로부터 단백질을 발현시키기 위해, 레서스 원숭이 CTLA-4 세포외 도메인(extracellular domain) 유전자를 포유류의 발현벡터인 pLNCX2(도 2의 (A), CLONTECH)에 클로닝하였다.

[0036] 먼저, 5′ 말단에 제한효소 Xho I 의 절단 부위 서열을 만드는 프라이머를 합성하여 중합효소연쇄반응으로 제한효소 절단부위를 만들고, 3′ 말단에도 제한효소 BamH I 의 절단 부위 서열을 만드는 프라이머를 합성하여 중합효소연쇄반응으로 제한효소 절단부위를 만들었다. 그 후, 인간 이뮤노글로불린(human IgG)의 Fc region의 cDNA를 레서스 원숭이 CTLA-4 세포외 도메인 유전자의 3′ 말단 쪽에 융합(fusion)시켰다. 상기 cDNA는 human peripheral lymphocyte로부터 mRNA를 추출한 후, 역전사를 통해 얻어낸 cDNA이다. 융합시 사용된 제한효소 부위는 5′ 말단에 제한효소 BamH I , 3′ 말단에 제한효소 Not I 을 사용하였다. 상기 제한효소 절단부위의 염기서열은 하기와 같다.

[0037] Xho I : CCG CTC GAG

[0038] BamH I : GGA TCC

[0039] Not I : GCG GCC GCC ACC

[0040] 여기서, 인간 이뮤노글로불린 Fc region 유전자 서열의 마지막 아미노산인 라이신(Lysine)을 시스테인(Cysteine)으로 치환하여 사용하였다. 상기 아미노산의 치환으로 이뮤노글로불린에 팔미트화(palmitoylation)를 일으켜 생체내 전달시 liposome 형태로 전달할 때 마이셀(micelle) 구조의 안정성을 증진시킨다 [Missirlis et al., 2009]. 그 결과, 도 1의 구조로 된 레서스 원숭이 CTLA-4 세포외 도메인 융합 이뮤노글로불린을 발현하는 재조합 벡터 RheCTLA-4IgG/pLNCX2(도 2의 (B))를 완성하였다.

[0041] 이후, 각각 Tetracycline off system의 293GPG 세포와 포유동물 유래 세포주인 CHO(Chinese Hamster Ovary) 세포를 사용하여 형질전환 시켰다. 먼저, 293GPG 세포를 6 well 조직 배양 플레이트에 well당 1×10^5 세포가 되도록 접종한 후, 10% 송아지 혈청을 함유한 DMEM 배지에서 배양하였다. 배양 24 시간 후, 세포가 well 표면의 70 ~ 80% 정도를 덮을 정도로 자라면, 혈청이 무첨가된 DMEM 배지에서 1 ~ 2 μg의 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린 발현 벡터 DNA를 6 ~ 8 μg의 Lipofectamine plus(Invitrogen)를 사용하여 293GPG 세포에 도입시켰다. 그 후, 상기 발현 벡터가 도입된 293GPG 세포를 24 시간 동안 배양하여 바이러스(레트로바이러스)를 포함하는 배양 상층액을 이용하여 숙주세포(CHO cell)를 4 ~ 5 시간 동안 배양한 후, 혈청이 10% 함유된 배지로 바

꿔서 24 시간 배양하였으며, 이 과정을 3회 반복하였다. 상기 CHO 세포는 형질도입된 세포를 얻기 위해 G418 항생제 1.5 mg/ml을 처리하여 유전자가 발현되는 세포를 얻었다.

[0042] **< 실시예 3. 단백질 발현 및 정제 >**

[0043] 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린 단백질이 포유류 세포에서 과발현 됨을 확인하기 위해, 형질전환된 CHO 세포에서 총 RNA(total RNA)를 추출하였다. RNA 추출방법은 상기 실시예 1의 방법과 동일하다. 이로부터 얻은 cDNA를 주형으로 레서스 원숭이 CTLA-4 ECD 유전자발현의 유무를 중합효소연쇄반응을 통하여 확인하였다. 또한 형질전환된 세포를 배양한 상층액에 발현되어 분비된 단백질을 확인하기 위해 ELISA 키트(R&D system)를 통하여 확인하였다.

[0044] 상기의 방법으로 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린 단백질의 발현을 확인 한 후, 확인된 형질전환 세포를 배양하여 얻은 배양상층액으로부터 발현 단백질을 정제하기 위하여 Protein A Agarose kit(553-50-00, KPL)를 사용하였다. 먼저, Protein A Agarose column에 wash/binding buffer(0.1M sodium phosphate, 0.15M NaCl, pH 7.4)를 통과시킨 후, 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린 단백질을 함유한 배양상청액을 통과시켜 Protein A와 이뮤노글로불린(IgG)과의 결합력을 이용하여 column에 흡착시켰다. 흡착된 단백질들은 Elution buffer(0.2M Glycine, pH 3±1.85)를 이용하여 다시 용출시켜 정제 하였다. 용출된 시료는 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 실시한 후, 쿠마지블루(coomassie blue)로 염색하여 발현된 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린 단백질을 확인하였다. 상기 단백질 정제 결과는 도 3에 나타내었다.

[0045] 도 3의 (A)는 발현벡터를 숙주세포인 CHO 세포에 도입한 후, 제대로 발현되는지를 확인하기 위하여 RT-PCR을 통해 확인한 결과이다. 사용되어진 프라이머와 product size는 하기 표 3에 나타내었다. 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린과 GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)가 도입된 각각의 세포에서 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린 유전자가 mRNA로 발현되는지를 레서스 원숭이 CTLA-4 염기서열에 맞는 프라이머를 이용하여 확인하였다. 상기 GAPDH는 세포내에서 발현량이 세포의 조건에 따라 잘 변하지 않는 유전자로써, 본 발명의 융합 이뮤노글로불린 발현량 조사에서 세포내 기준으로 사용되었다.

[0046] 도 3의 (B)는 유전자가 도입된 CHO 세포를 배양하고 배양된 상청액에서 정제한 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린 단백질을 정제한 후 SDS-PAGE를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다. 아미노산의 수만을 이용하여 계산한 결과 약 40.8 KDa 이지만, 측정된 단백질의 크기는 글라이코실레이션(glycosylation)을 통한 단백질 변형(protein modification)에 의해 계산된 사이즈보다 조금 큰 사이즈의 단백질이 발현됨을 확인하였다. 상기 확인된 단백질들은 PBS에 투석하여 평형에 이르게 한 후, -70 ℃에 보관하였다가 면역억제 실험에 사용하였다.

[0047] [표 3. 프라이머와 PCR product의 size]

[0048]

	프라이머		size
Rhe CTLA-4 ECD	정방향	5'- GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC ATG CAC GTG GCC CAG	399 bp
	역방향	3'- CGC GGA TCC GTC AGA ATC TGG GCA CGG	
GAPDH	정방향	5'- ATG ACC ACA GTC CAT GCC ATC	271 bp
	역방향	3'- CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG	

[0049] **< 실시예 4. 레서스 원숭이 T 세포의 활성 억제 효과 측정 >**

[0050] 레서스 원숭이 T 세포의 활성 억제 효과를 측정하기 위해, MLR(Mixed lymphocyte Reaction) 방법을 이용하여 레서스 원숭이의 면역세포 기능 억제를 확인하였다. 본 발명에서는 MHC haplotype이 다른 effector cell과 target cell과의 반응을 수행하여 면역반응이 나타나게 하였다. 즉 장기이식의 경우 장기거부반응이 나타나게 되는 것과 같다. 면역반응이 나타나게 되면 T 세포가 증식하게 되고, T 세포의 증식동안 배양액에 포함된 방사선동위원소 ^{3}H가 T 세포 내에 축적되게 된다. 반응 후, 세포에 축적된 ^{3}H를 측정함으로써 면역활성을 비교할 수 있다. 상

기 과정을 하기에 구체적으로 설명하였다.

[0051] 먼저, 레더스 원숭이의 PBMC에서 분리한 T 림프구 1×10^5 세포를 effector로 사용하였다. 또한 이와 다른 MHC haplotype을 갖는 다른 레더스 원숭이의 PBMC 1×10^5 세포를 광조사(irradiation)시켜 세포를 비활성화 시킨 후 target 세포로 상기 effector 세포와 함께 배양하였다. 배양한지 24, 48, 72 시간 후, 각각 T 세포의 활성 억제 효과를 측정하였다. 이때, 방사성 동위원소가 표시된 ^3H를 12 시간 전에 effector 세포에 처리하고 분열한 세포에서 uptake한 방사성 동위원소의 양을 측정하였다. 측정 결과는 도 4에 나타내었다.

[0052] 도 4에 나타낸 것과 같이, 레더스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린 단백질이 기존의 생쥐 유래 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린 단백질보다 레더스 원숭이 T 세포의 활성을 더 효과적으로 억제함을 관찰할 수 있었다.

산업이용 가능성

[0053] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 레서스 원숭이(Rhesus monkey)의 CTLA-4를 이용하여 항체 재조합 단백질(융합 이뮤노글로불린)을 제조할 수 있다.

[0054] 본 발명의 실시예를 통해 살펴본 바와같이, 본 발명의 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린을 레서스 원숭이 T 세포에 처리하는 경우 기존에 사용하던 타종의 CTLA-4 융합 단백질보다 더 효과적으로 T 세포의 활성을 억제함을 확인하였다. 따라서 본 발명의 종 특이적인 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린을 사용함으로써 레서스 원숭이를 이용한 동종장기이식 실험시 면역억제의 효율을 높일 수 있으며, 상기 융합 이뮤노글로불린을 유효성분으로 포함하는 면역세포 증식 억제제의 사용이 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0055] 도 1은 레서스 원숭이 CTLA-4 이뮤노글로불린의 발현을 위한 유전자 구축 모식도를 나타낸다.

[0056] 도 2의 (A)는 발현벡터 pLNCX2의 개열지도를 나타내며, (B)는 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하는 재조합 벡터 RheCTLA-4IgG/pLNCX2의 개열지도를 나타낸다.

[0057] 도 3은 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린 단백질 정제 결과를 나타낸다.

[0058] 도 4는 레서스 원숭이 CTLA-4 융합 이뮤노글로불린 단백질의 레서스 원숭이 T 세포의 활성 억제 결과를 나타낸다.

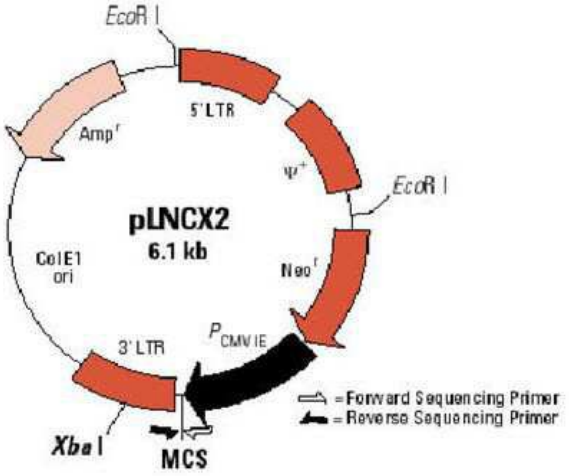
도면

도면1



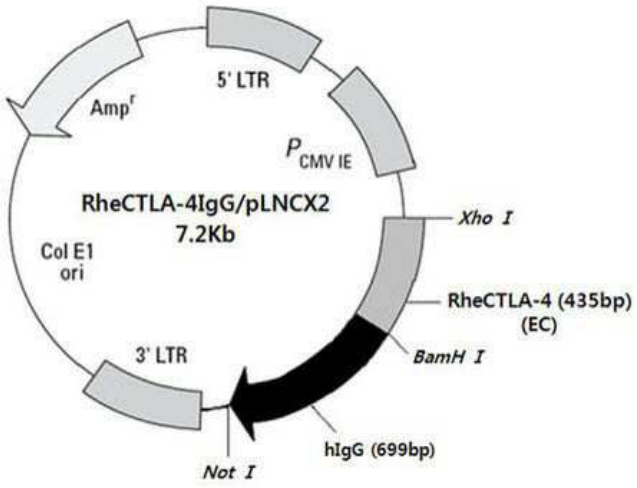
도면2

(A)

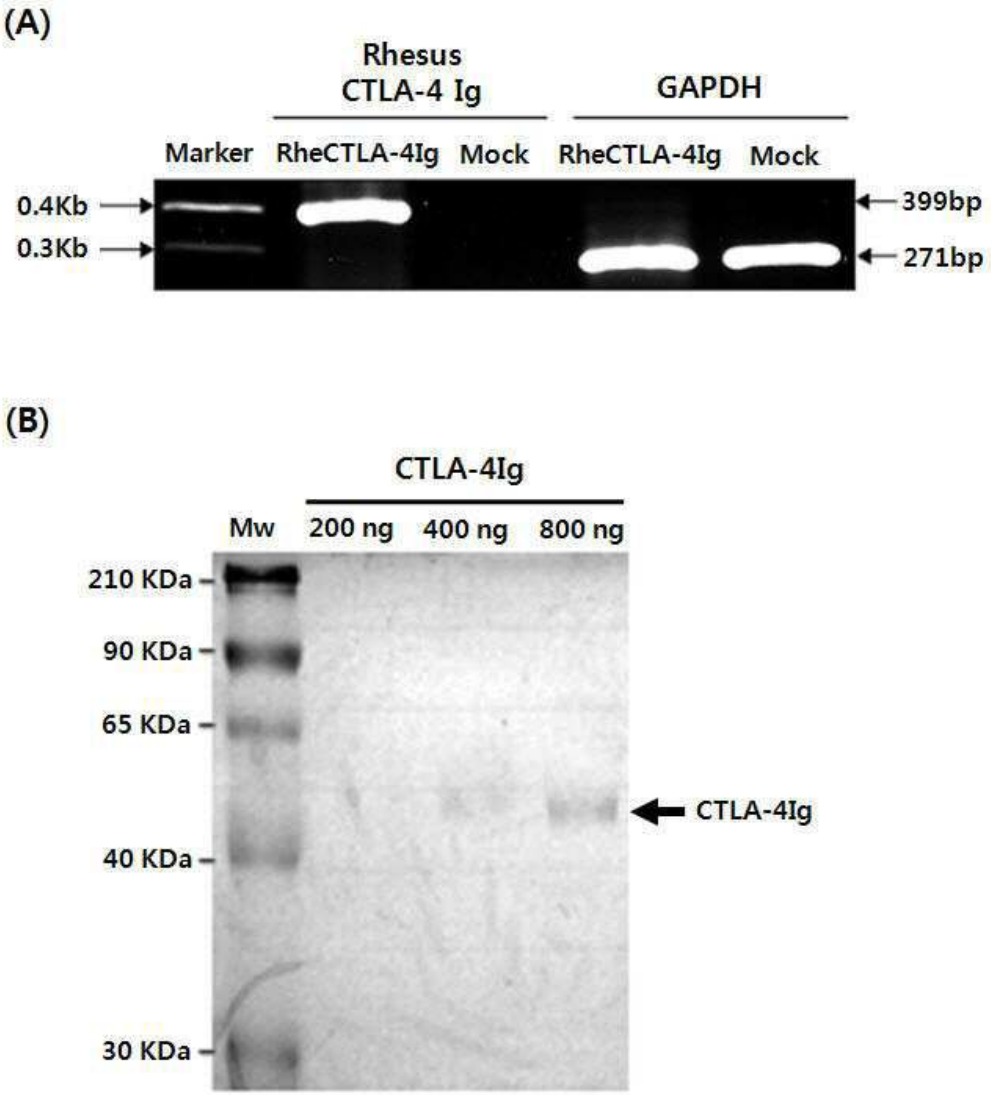


MCS (multi cloning site)의 제한효소 부위

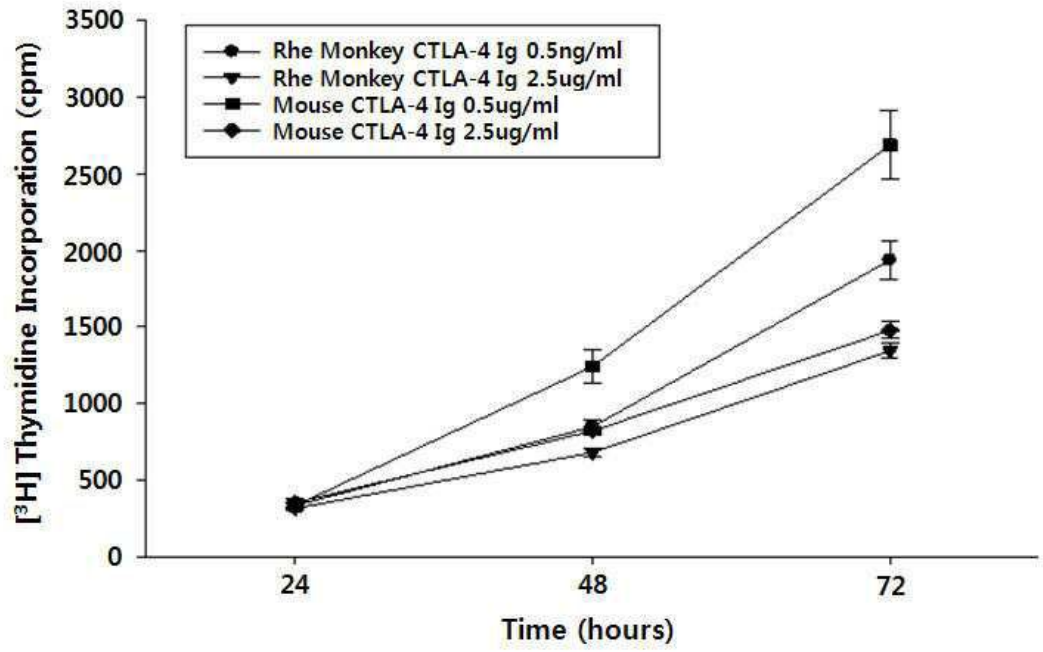
(B)



도면3


(A)
Rhesus CTLA-4 Ig
GAPDH
Marker
RheCTLA-4Ig
Mock
RheCTLA-4Ig
Mock
0.4Kb
0.3Kb
399bp
271bp
(B)
CTLA-4Ig
Mw
200 ng
400 ng
800 ng
210 KDa
90 KDa
65 KDa
40 KDa
30 KDa
CTLA-4Ig

도면4



서 열 목 록

<110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation
<120> Rhesus monkey CTLA-4 fusion Ig

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 672
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA sequence for Rhesus monkey CTLA-4

<400> 1
atggcttgcc ttggatttca gcggcacaag gctcggctca acctggctac caggacccgg 60

ccctacactc tcctgttttc tcttctcttc atccctgtct tctccaaagc aatgcacgtg 120

gcccagcctg ctgtggtgct ggccaacagc cgagggatcg ccagctttgt gtgtgagtat 180

gcatctccag gcaaagccac tgaggtccgg gtgacagtgc ttcggcaggc cgacagccag 240

gtgactgaag tctgtgcggc aacatacatg atggggaatg agttgacctt cctagatgat 300

tccatctgca cgggcacctc cagtggaaat caagtgaacc tcactatcca aggactgagg 360

gctatggaca caggactcta catctgcaag gtggagctca tgtacccacc accatactac 420

atgggcatag gcaatggaac ccagatttat gtaattgatc cagaaccgtg cccagattct 480

gacttcctcc tctggatcct tgcagcagtt agttcggggt tgtttttta tagctttctc 540

ctcacagctg tttctttgag caaaatgcta aagaaaagaa gccctctcac aacaggggtc 600

tatgtgaaaa tgcccccaac agagccagaa tgtgaaaagc aatttcagcc ttattttatt 660

cccatcaatt ga 672

<210> 2
<211> 223
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid sequence for Rhesus monkey CTLA-4

<400> 2
Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Arg Leu Asn Leu Ala
1 5 10 15

Thr Arg Thr Arg Pro Tyr Thr Leu Leu Phe Ser Leu Leu Phe Ile Pro
20 25 30

Val Phe Ser Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
35 40 45

Asn Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
50 55 60

```
Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
 65                  70                  75                  80

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
                 85                  90                  95

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
            100                 105                 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
        115                 120                 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Met Gly Ile Gly
    130                 135                 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
145                 150                 155                 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe
                165                 170                 175

Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys
            180                 185                 190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
        195                 200                 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
    210                 215                 220
```

<210> 3
<211> 1428
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA sequence for Rhesus monkey CTLA-4 fusion immunoglobulin

<400> 3
atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60

gactttactg tcacggttcc caaggaccta tatgtggtag agtatggcag caatatgaca 120

attgaatgca gattcccagt agaaaaacaa ttaggcctga cttcactaat tgtctattgg 180

gaaatggagg ataagaacat tattcaattt gtgcatggag aggaagacct gaaggttcag 240

catagtaact atagacagag ggcccagctg ttgaaggacc agctctccct gggaaatgct 300

gcacttcgga tcacagatgt gaaattgcag gatgcagggg tttaccgctg catgatcagc 360

tatggtggtg ccgactacaa gcggattacc gtgaaagtca atgctccata caacaaaatc 420

aaccaaagaa ttttggttgt cgatccagtc acctctgaac atgaactaac atgtcaggct 480

gagggctacc ccaaggccga agtcatttgg acaagcagtg accatcaagt cctgagtggt 540

aagaccacca ccaccaattc caagagagag gagaagcttt taaatgtgac cagcacactg 600

agaatcaaca caacagctaa tgagattttc tactgcattt ttaggagatt aggtcctgag 660

gaaaaccata cagctgaatt ggtcatccca gaactacctc tggcgcttcc tccaaatgaa 720

aggggatccg agcccaaatc ttgtgacaaa actcacacat gcccaccgtg cccagcacct 780

gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc ttcccccaa aacccaagga caccctcatg 840

atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 900

gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 960

gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 1020

tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc 1080

gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1140

ccatcacgag atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 1200

tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1260

accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg 1320

gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1380

cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gttgttga 1428

<210> 4
<211> 475
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amino acid for Rhesus monkey CTLA-4 fusion immunoglobulin

<400> 4
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val
20 25 30

Val Glu Tyr Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu
35 40 45

Lys Gln Leu Gly Leu Thr Ser Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp
50 55 60

Lys Asn Ile Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln
65 70 75 80

His Ser Asn Tyr Arg Gln Arg Ala Gln Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser
85 90 95

Leu Gly Asn Ala Ala Leu Arg Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala
100 105 110

Gly Val Tyr Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg
115 120 125

Ile Thr Val Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile

130 135 140

Leu Val Val Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala
145 150 155 160

Glu Gly Tyr Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln
165 170 175

Val Leu Ser Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys
180 185 190

Leu Leu Asn Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Ala Asn Glu
195 200 205

Ile Phe Tyr Cys Ile Phe Arg Arg Leu Gly Pro Glu Glu Asn His Thr
210 215 220

Ala Glu Leu Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala Leu Pro Pro Asn Glu
225 230 235 240

Arg Gly Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
245 250 255

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
260 265 270

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
275 280 285

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
290 295 300

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
305 310 315 320

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
325 330 335

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
340 345 350

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
355 360 365

```
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
    370                 375                 380

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
385                 390                 395                 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
                405                 410                 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
            420                 425                 430

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
        435                 440                 445

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
    450                 455                 460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Cys
465                 470                 475
```